



- (74) 代理人: 大井 正彦 (OHI,Masahiko); 〒101-0052 東京都千代田区 神田小川町三丁目 6 番地 1 栄信ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## 添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 細胞反応検査用装置および細胞反応検査方法

技術分野

本発明は、細胞において、細胞刺激物質が接触することにより生ずる細胞反応による結果を検出する細胞反応検査を行うための細胞反応検査用装置、並びに、当該細胞反応検査用装置を利用して細胞反応検査を実行する細胞反応検査方法に関する。

背景技術

現在、生きている細胞に対して種々の生理活性物質を始めとする細胞刺激物質を含有する試験液を供給し、当該細胞において、細胞刺激物質が接触することにより生起される細胞反応を生じさせ、これにより、当該細胞反応における結果を検出する細胞反応検査、または、当該細胞刺激物質によっては細胞反応が生起されないことを検出する細胞反応検査を行うことにより、特定種類の細胞に対する当該細胞刺激物質による効能、または、当該細胞刺激物質に対する細胞の耐性などの種々の評価を行うことが行われている。

一般に、上記のような細胞反応検査は、例えばプラスチックシャーレに添加された培地に播種された細胞に対して、種々の細胞刺激物質を含有する試験液を、例えば添加して供給することにより実行される。そして、その結果、例えば当該細胞における細胞反応が生じた後に、試験液を回収してこの試験液を分析することにより、また、蛍光色素標識プローブを使用して直接細胞を観察することにより、更には、反応に供された細胞を回収して分析することにより、当該細胞反応の結果を検出することが行われ、この検出結果に基づいて種々の評価が行われる。

しかしながら、従来における細胞反応検査を実行する方法においては、種々の

反応条件を高い自由度で設定することが困難である。例えば、単一の細胞に対して複数種類の細胞刺激物質を利用した逐次反応を実行するための条件、または複数の種類の細胞による反応を組み合わせた条件で所期の細胞反応検査を実行することが困難である。

一方、新薬の開発においては、例えばラットなどを利用した動物実験により各種の薬剤候補物質のスクリーニング、毒性、薬剤に対する耐性などの評価が行われている。しかしながら、このような動物実験においては、利用される供試動物に大きな個体差があるのみではなく、飼育維持などに手間がかかり、更には、動物実験を行うこと自体が動物愛護に関する倫理的な観点から好ましくない、などの種々の問題がある。

### 発明の開示

本発明は、以上のような事情に基づいてなされたものであって、その目的は、実行すべき細胞反応検査の種類に応じて必要とされる、細胞反応サイトに対する液体流通経路を大きな自由度で設定することができる液体プロセッサー用デバイスによる細胞反応検査用装置を提供することにある。

本発明の他の目的は、上記の細胞反応検査用装置を利用した細胞反応検査方法を提供することにある。

本発明の細胞反応検査用装置は、板状の基材と、

この基材に形成された、第1の方向に伸びる複数の第1の微小流路および前記第1の方向と異なる第2の方向に伸びる複数の第2の微小流路と、

第1の微小流路と第2の微小流路との交差部に形成された微小空間部と、

微小空間部に連通する微小流路に設けられた、当該微小流路を開閉するバルブと、

当該バルブの各々をその閉止状態と開放状態との間で制御するバルブ制御機構とを備えてなる液体プロセッサー用デバイスよりなり、

生きている細胞が位置された選択された微小空間部に連通する微小流路の1つを介して当該細胞の生存に必要な液体培地が供給されると共に、当該微小空間部

に連通する他の微小流路を介して細胞刺激物質を含有する試験液が供給され、当該試験液によって生ずる当該細胞における反応を検査する細胞反応検査に用いられることを特徴とする。

本発明の細胞反応検査方法は、板状の基材と、

この基材に形成された、第1の方向に伸びる複数の第1の微小流路および前記第1の方向と交差する第2の方向に伸びる複数の第2の微小流路と、

第1の微小流路と第2の微小流路との交差部に形成された微小空間部と、

微小空間部に連通する微小流路に設けられた、当該微小流路を開閉するバルブと、

当該バルブの各々をその閉止状態と開放状態との間で制御するバルブ制御機構とを備えてなる液体プロセッサー用デバイスを用い、

細胞が位置された選択された微小空間部に、当該微小空間部に連通する微小流路の1つを介して当該細胞の生存に必要な液体培地を供給すると共に、当該微小空間部に連通する他の微小流路を介して細胞刺激物質を含有する試験液を供給し、これによって生ずる当該細胞における反応を検査することを特徴とする。

上記において、複数の微小空間部に同一種の細胞が位置され、当該複数の微小空間部に、細胞刺激物質を含有する異なる試験液が供給されることが好ましい。

また、複数の微小空間部に異種の細胞が位置され、当該複数の微小空間部に、細胞刺激物質を含有する同一の試験液が供給されることが好ましい。

本発明の細胞反応検査方法は、板状の基材と、

この基材に形成された、第1の方向に伸びる複数の第1の微小流路および前記第1の方向と交差する第2の方向に伸びる複数の第2の微小流路と、

第1の微小流路と第2の微小流路との交差部に形成された微小空間部と、

微小空間部に連通する微小流路に設けられた、当該微小流路を開閉するバルブと、

当該バルブの各々をその閉止状態と開放状態との間で制御するバルブ制御機構とを備えてなる液体プロセッサー用デバイスを用い、

細胞が位置された選択された微小空間部に、当該微小空間部に連通する微小流

路の1つを介して当該細胞の生存に必要な液体培地を供給すると共に、当該微小空間部に連通する微小流路の他の1つを介して細胞刺激物質を含有する第1の試験液を供給する第1の試験処理と、

この第1の試験処理の後、当該微小空間部に連通する微小流路のバルブの開閉状態を切り換えることにより、第1の試験液の供給を停止すると共に、当該第1の試験液の供給経路と異なる供給経路により、細胞刺激物質を含有する、第1の試験液とは異なる第2の試験液を供給する第2の試験処理とが行われ、これによって生ずる当該細胞における反応を検査することを特徴とする。

ここで、第1の試験液および第2の試験液は、互いに種類または濃度が異なる細胞刺激物質を含有してなるものであることが好ましい。また、微小空間部に位置される細胞が動物の臓器または器官に由来する細胞であり、第1の試験液および第2の試験液に含有される細胞刺激物質が、細胞成長因子、細胞増殖因子、ホルモン、栄養素および血清から選ばれたものであることが好ましい。

以上において、細胞における反応の検査が、当該細胞によって產生される產生物質の検出であることが好ましい。

本発明の細胞反応検査方法は、板状の基材と、

この基材に形成された、第1の方向に伸びる複数の第1の微小流路および前記第1の方向と交差する第2の方向に伸びる複数の第2の微小流路と、

第1の微小流路と第2の微小流路との交差部に形成された微小空間部と、

微小空間部に連通する微小流路に設けられた、当該微小流路を開閉するバルブと、

当該バルブの各々をその閉止状態と開放状態との間で制御するバルブ制御機構とを備えてなる液体プロセッサー用デバイスを用い、

各々細胞が位置された選択された複数の微小空間部に、当該複数の微小空間部の各々に連通する微小流路の1つを介して細胞の生存に必要な液体培地を供給すると共に、当該複数の微小空間部の各々に連通する微小流路の他の1つを介して細胞刺激物質を含有する試験液を供給する細胞反応検査において、

第1の細胞による細胞反応結果物が第2の細胞に供給されることを特徴とする。

本発明の細胞反応検査用装置によれば、液体プロセッサー用デバイスにおいて、微小流路網を構成する微小流路に係るバルブにおける開閉状態が選択的に制御されて、大きな自由度で液体流通経路が設定された液体プロセッサーを利用するにより、選択された微小空間部に位置された生きた細胞に対して大きな自由度をもって反応条件を設定することが可能である。

従って、同一の細胞反応検査用装置において複数の液体流通経路を形成することができる、複数の細胞反応検査を同時に実行する状態を容易に実現することができ、必要に応じて当該複数の細胞反応検査における反応条件の同一性を、高い精度で達成することができる。

また、細胞反応検査用装置として利用される液体プロセッサーを、マイクロリアクターとして構成することにより、必要とされる試薬の量がきわめて微量で、経済的に有利な条件で、所期の細胞反応を実行することができる。

本発明の細胞反応検査方法によれば、上述の細胞反応検査用装置を用いることにより、選択された微小空間部に位置された生きた細胞に対して、大きな自由度をもって反応条件を設定することができるため、当該細胞において種々の異なる条件で所期の反応を容易に行うことができると共に、当該反応による結果を高い効率で検出することができる。

また、細胞反応をきわめて小さいスケールで行うことが可能であるため、当該細胞反応の結果を短時間で得ることができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の細胞反応検査用装置を構成する液体プロセッサー用デバイスの構成の一例を模式的に示す説明図である。

図2は、バルブの具体的な構成を示す説明用断面図である。

図3は、縦方向微小流路および横方向微小流路の交差部における微小空間部の具体的な構成を、横方向微小流路に垂直な断面で示す説明用断面図である。

図4は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの具体例を示す説明図である。

図5は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの具体例を示す説明図である。

図6は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの他の具体例を示す説明図である。

図7は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの他の具体例を示す説明図である。

図8は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの他の具体例を示す説明図である。

図9は、図8に示す液体プロセッサーにおいてバルブの開閉状態が制御されて切り換えられた具体例を示す説明図である。

図10は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの他の具体例を示す説明図である。

#### [符号の説明]

10 液体プロセッサー用デバイス

12 基材

H1, H2 横方向微小流路

V1, V2 縦方向微小流路

H1i, H2i 開口

V1o, V2o 開口

X1~X4 微小空間部

A, B, C 領域

a, b, c 領域

20 球状空間

22 一方の細孔

24 他方の細孔

22A 主部分

22B 屈曲部分

23、25 開口

28 バルブボール

30 可磁性化膜

31 微小空間部

32 上部空間

33 下部空間

34 膜状細胞支持部材

35A、35B 縦方向微小流路

36A、36B 横方向微小流路

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

図1は、本発明の細胞反応検査用装置を構成する液体プロセッサー用デバイス（以下、単に「デバイス」という。）の構成の一例を模式的に示す説明図である。

図1の例において、デバイス10は、全体が矩形の板状の基材12において、その肉厚部内を、その面方向において各々水平方向に伸びて両端が左右両側縁において開口し、トンネル状の2本の横方向微小流路H1、H2が互いに上下方向に離間して形成されていると共に、当該面方向において各々垂直方向に伸びて両端が上下両端縁において開口する、トンネル状の2本の縦方向微小流路V1、V2が互いに左右方向に離間して形成されており、この横方向微小流路H1、H2および縦方向微小流路V1、V2が、合計4つの微小空間部X1、X2、X3およびX4において互いに交差する構成とされており、これにより微小流路網が形成されている。

この図において、H1i、H2i、V1iおよびV2iは、基材12の左側縁および上側縁に位置された開口、H1o、H2o、V1oおよびV2oは、基材12の右側縁および下側縁に位置された開口である。

具体的に説明すると、上部の横方向微小流路（以下、「上部横流路」という。）H 1と左側の縦方向微小流路（以下、「左側縦流路」という。）V 1とが微小空間部X 1において交差しており、上部横流路H 1と右側の縦方向微小流路（以下、「右側縦流路」という。）V 2とが微小空間部X 2において交差し、下部の横方向微小流路（以下、「下部横流路」という。）H 2と左側縦流路V 1とが微小空間部X 3において交差しており、下部横流路H 2と右側縦流路V 2とが微小空間部X 4において交差している。

そして、上部横流路H 1、下部横流路H 2、左側縦流路V 1および右側縦流路V 2の各々が、当該流路上における2つの交差部によって分割されて形成されている3つの流路部分の各々には、当該流路部分を開閉するバルブが設けられている。

この図の例において、上部横流路H 1および下部横流路H 2で区画される上下方向に並ぶ3つの領域を上から順にA、BおよびCとし、また左側縦流路V 1および右側縦流路V 2で区画される左右方向に並ぶ3つの領域を左から順にa、bおよびcとし、各バルブ並びに流路部分を、それが位置する微小流路の符号と領域の符号とを連記することにより、特定することとする。

例えば、上部横流路H 1の左側領域aにおける流路部分におけるバルブは「バルブH 1 a」のように表記される。

従って、上部横流路H 1の各流路部分にはバルブH 1 a、H 1 bおよびH 1 cが、下部横流路H 2の各流路部分にはバルブH 2 a、H 2 bおよびH 2 cが、左側縦流路V 1の各流路部分にはバルブV 1 A、V 1 BおよびV 1 Cが、右側縦流路V 2の各流路部分にはバルブV 2 A、V 2 BおよびV 2 Cが、それぞれ設けられた状態とされている。

図2は、バルブの具体的な構成を示す説明用断面図である。

この図において、基材1 2の肉厚部（図2における斜線部）中には、バルブ室を構成する比較的大きな内径を有する球状空間2 0が形成されており、各々、この球状空間2 0に開口することによって互いに連通される一方の細孔2 2と他方の細孔2 4とにより、流路部分が形成されている。

一方の細孔22は、基材12の表面に沿って伸びる主部分22Aと、この主部分22Aに連続する「コ」字状の屈曲部分22Bとを有してなり、屈曲部分22Bは、球状空間20の上部において円形の開口23を介して当該球状空間20に連通している。この開口23は、その周縁がバルブの弁座となるものである。また、他方の細孔24は、基材12の表面に沿って伸び、球状空間20の側部に開口25において連通している。

球状空間20内には、一方の細孔22に係る開口23および他方の細孔24に係る開口25の径のいずれよりも大きい外径を有する、バルブの弁体となるバルブ粒子を構成するバルブボール28が配置されている。このバルブボール28は磁場感応性物質、例えば鉄、ニッケル、コバルトなどの強磁性体よりなるものとされている。そして、このバルブボール28を基材12の厚さ方向に移動させるための可磁性化膜30が、基材12の表面の全体に設けられている。

この可磁性化膜30は、そのいずれかの球状空間20に対向する部分を磁化させると、その結果当該部分に生ずる磁場の作用により、当該球状空間20におけるバルブボール28を吸引力によって移動させて一方の細孔22に係る開口23の周縁に押圧させ、これにより、当該開口23を塞いで当該一方の細孔22と球状空間20との連通を遮断し、もって当該流路部分を液体の流通が禁止された状態とするものである。すなわち、当該可磁性化膜30は、当該バルブに対するバルブ制御機構としての作用を有するものであり、このバルブ制御機構が駆動されることにより、開放状態にあったバルブが閉止状態とされる。

ここで、可磁性化膜30としては、例えば、磁気カードの処理に利用されているカードライターや、パソコンのハードディスクドライブの記憶方式によるものを用いることができる。

以上の構成によれば、一旦、閉止状態とされたバルブは、当該部分が消磁されるまでの間は、そのまま閉止状態を維持することができる一方、可磁性化膜の磁化された部分を消磁することによってバルブを開放状態とすることができますので、一旦形成された液体流通経路の設定状態をリセットすることができ、その結果、デバイス10それ自体を繰り返し使用することが可能となる。

また、当該デバイス10を磁化装置上で使用することにより、液体流通経路が一旦設定されたデバイス10において微量反応などをを行いながら、適宜のバルブの開閉状態を制御することが可能となり、その結果、液体流通経路の変更を自由に行うことが可能となる。

図3は、縦方向微小流路および横方向微小流路の交差部における微小空間部の具体的な構成を、横方向微小流路の延伸方向に垂直な断面で示す説明用断面図である。

この図に示すように、微小空間部31は、基材12の肉厚部中において、上下方向に伸びる全体が円柱状の空隙により形成されている。この微小空間部31の内部には、細胞を支持するが液体の透過を許容する膜状細胞支持部材34が、面方向に伸びるよう配設されており、この膜状細胞支持部材34により分割された状態で、上部空間32および下部空間33が形成されている。

そして、微小空間部31の上部空間32には、縦方向微小流路35Aおよび横方向微小流路36Aが開口し、また、下部空間33には、縦方向微小流路35Bおよび横方向微小流路36Bが開口することによって互いに連通されて液体流通経路が形成されている。

微小空間部31に開口する、縦方向微小流路35A、36Bおよび横方向微小流路36A、36Bに係る開口部の各々においては、必要に応じて、例えば種々のメッシュ状部材よりなる細胞流失防止部材（図示せず）が設けられており、これにより液体の通過が許容されると共に、微小空間部31内に位置された細胞が流失することが防止されている。

また、デバイス10においては、対象となるデバイスにおけるすべてのバルブに係るバルブ制御機構の個々のものを駆動する機能を有する流路部分開閉機構が設けられると共に、当該デバイスの微小流路網情報およびバルブの位置に関する情報が記憶されたコンピュータよりなる流通経路設定装置が設けられている。

この流通経路設定装置においては、適宜の形の信号による液体流通経路設定指示により、選択された流路部分以外の流路部分に係るバルブが閉止状態となるよう流路部分開閉機構が駆動され、これにより、特定の微小空間部を介して連通す

る所要の液体流通経路が設定されて、デバイス10が液体プロセッサーとされ、この液体プロセッサーが細胞反応検査用装置として利用される。

以上において、基材12を構成する材質としては、例えばガラス、樹脂または金属など、用いる細胞の生活状態を阻害しないものを挙げることができ、製造が容易であることから、特に樹脂を用いることが好ましい。

以上において、基材12を構成する材質として、例えばガラスまたは透明性樹脂などの光透過特性を有するものを利用することが好ましく、これにより、微小空間部における細胞の目視による観察を可能とすることができる。

また、基材12における寸法、形状などの条件は自由に決定することができるが、その一例を挙げると、縦30mm、横30mm、厚さ5mmの正方形のものである。

また、微小流路の各々は、通常の液体（例えば水）が流通することのできるものであればよく、例えば内径が30μmの円形トンネル状とされ、この場合の液体の流量は例えば0.5μL／分とされる。

バルブにおいて、球状空間20の内径は例えば80μmであり、バルブボール28の外径は例えば40μmである。

微小空間部31としては、例えば0.0008～20μlの容積を有するものとすることができます、例えば高さが100～3000μm、特に好ましくは200～2000μmであり、直徑が100～3000μm、特に好ましくは200～2000μmである円柱状のものを好ましく用いることができるが、この微小空間部の形態は、特に制限されるものではなく、目的とする細胞反応に応じた大きさ、形状とすることができます、例えば球状、直方体形状としてもよい。

このようなデバイス10においては、図示しない、例えばマイクロポンプよりなる液体供給機構が備えられることにより、基材12の外周縁における適宜の開口から必要とされる液体が、微小流路に流入される。

また、上記の構成を有するデバイスは、種々の方法によって製造することができるが、具体的には、いわゆる光造形加工法を利用することが好ましい。

以上のような構成のデバイス10よりなる細胞反応検査用装置においては、適

宜のバルブにおける開閉状態が制御されて液体プロセッサーとされ、その状態において、以下のようにして、本発明の細胞反応検査方法が実行される。

すなわち、本発明の細胞反応検査方法においては、先ず、微小空間部における膜状細胞支持部材に生きた細胞が播種されると共に、細胞反応検査用装置を構成するデバイス10におけるバルブの開閉状態が制御されることにより、細胞反応サイトである当該細胞が位置された微小空間部に連通する液体流通経路が形成される。そして、当該液体流通経路を介して当該微小空間部に対して液体培地が継続的に供給されることによりいわゆるコンディショニングが行われ、これにより、当該細胞が膜状細胞支持部材に確実に付着または固定された状態が達成される。

ここで、細胞が位置されるべき微小空間部としては、目的とされる微量反応である細胞反応の種類に応じて形成される液体流通経路を考慮して適宜選択されればよい。

例えば図4に示すように、図1に示されたデバイス10において、選択された微小空間部X4に細胞が位置され、バルブH2c、V1B、V1CおよびV2Bが閉止状態とされると共にこれら以外のバルブが開放状態とされることにより、流路部分H2aにおける基材12の外周縁に形成された開口H2iから、流路部分H2a、微小空間部X3および流路部分H2bを介して微小空間部X4に至り、当該微小空間部X4から流路部分V2Cを介してその開口V2oに至る液体排出路に連通する液体流通経路が形成された状態が実現され、これにより、第1の液体プロセッサーが構成されている。

この液体プロセッサーにおいて、液体培地が、開口H2iから流入されて前記液体流通経路を流通して微小空間部X4に供給され、開口V2oから排出されることにより、当該微小空間部X4に位置された細胞のコンディショニングが行われる。

このコンディショニングは、検査に用いられる細胞の種類、その他の条件によって決定される特定時間の間行われればよく、例えば12時間行われる。

上述のようなコンディショニングが行われた後、液体培地が継続的に供給され

た状態において、バルブの開閉状態が制御されることにより、細胞が位置された微小空間部X 4に通じる、液体培地が流通される液体流通経路（以下、「液体培地供給経路」ともいう。）とは異なる他の液体流通経路（以下、「試験液供給経路」ともいう。）が形成され、この試験液供給経路を介して、選定された種類の細胞刺激物質が設定された濃度で含有された試験液が微小空間部X 4に供給されることにより細胞反応検査が実行される。

具体的には、図4に示した例の液体プロセッサーは、図5に示すように、バルブV 2 Bが開放状態とされると共にバルブH 1 bおよびH 1 cが閉止状態とされて、全体として、バルブH 1 b、H 1 c、H 2 c、V 1 B、およびV 1 Cが閉止状態とされると共に、これら以外のバルブが開放状態とされることにより、開口H 2 iから流路部分H 2 a、微小空間部X 3および流路部分H 2 bを介して微小空間部X 4に連通する液体培地供給経路と、開口V 2 iから流路部分V 2 A、微小空間部X 2および流路部分V 2 Bを介して微小空間部X 4に連通する試験液供給経路と、微小空間部X 4から流路部分V 2 Cを介して開口V 2 oに連通する液体排出路とが形成され、他の各流路部分H 1 a、H 1 b、H 1 c、H 2 c、V 1 A、V 1 BおよびV 1 Cにおいて液体の流通が禁止された状態が実現される。これにより、第2の液体プロセッサーが構成されている。

この第2の液体プロセッサーにおいて、液体培地が開口H 2 iから流入されて微小空間部X 4に供給されると共に、細胞刺激物質を含有する試験液が開口V 2 iから流入されて微小空間部X 4に供給され、微小空間部X 4からの液体が液体排出路を介して外部へ排出されることにより、細胞反応検査が実行される。

そして、当該細胞反応に供された細胞における反応の有無、生起された反応の種類、または、その反応の大きさなどの結果の検出が、適宜の手段により行われ、これにより、試験液または細胞についての種々の評価が行われる。

細胞反応検査における細胞反応の結果の検出方法としては、特に限定されるものではなく、細胞反応検査の目的などに応じた種々の方法により行うことができ、例えば微小空間部に対する試験液の供給を終了した後に、当該微小空間部から細胞を摘出し、当該細胞における生活状態または活性状態の変化、反応生成物の

有無、またはその量などを検出する方法、微小空間部から液体排出路を介して排出された排出液における組成の変化を調べて、例えば細胞によって産生される産生物質を検出する方法、または適宜の液体流通経路を通じてキャリアー液を当該微小空間部に供給させて、排出されたキャリアー液における組成の変化を調べて、例えば細胞によって産生される産生物質を検出する方法などを挙げることができる。

また、微小空間部に対して試験液が供給される前およびその後における、蛍光色素標識プローブによる蛍光発光強度の比較評価により細胞反応の程度を検出する方法を利用することも可能である。

ここで、細胞反応の結果の検出に、キャリアー液を利用する場合において、当該キャリアー液の組成は、種々の条件、または目的に応じて決定することができる。

具体的に説明すると、例えば細胞反応検査に供される細胞が肝実質細胞である場合には、前記排出液に含有されるアルブミンの量を検出することにより、当該肝実質細胞における活性状態を検査することができる。

以上において、細胞反応検査に用いられる液体培地としては、細胞を生活状態に維持するものであれば特に制限されるものではないが、用いられる細胞の種類、試験液に含有される細胞刺激物質の種類、その他種々の条件に応じて適宜選択されればよい。

液体培地としては、細胞の生活状態を維持するものであって、細胞刺激物質を含有しないものが用いられ、例えば炭酸ガスなどでペーハー値 (pH) が調整された、牛胎児血清 (FCS) 、馬胎児血清 (FHS) 、牛血清 (BS) 、ヒト血清などを含有する、ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM) 、ミニマルエッセンシャルメディウム (Minimal Essential Medium: MEM) 、ハム F 12 培地 (F 12 メディウム) 、ローズウェルパークメモリアルインスティチュート 1640 培地 (Roswell Park Memorial Institute 1640 培地: RPMI 1640) 、WI 、SFM

-101、UCメディウム102、UCメディウム199、ESなどが好適に用いられる。

以上において、細胞のコンディショニングを行うに際して微小空間部に対して供給される液体培地の量としては、例えばその組成、濃度、用いられる細胞の種類、量、微小空間部の形状、容積など種々の条件に応じて設定されればよく、例えば $0.01\sim200\mu l$ /分とされる。

また、細胞反応検査において、微小空間部に対して供給される液体培地の量としては、例えばその組成、濃度、用いられる細胞の種類、量、微小空間部の形状、容積など種々の条件に応じて設定すればよく、例えばラットに由来する肝実質細胞300個に対して、10%FCS含有DMEM液体培地を供給する場合においては、 $0.005\sim500\mu l$ /分、特に $0.02\sim100\mu l$ /分とすることが好ましい。

また、試験液は、細胞刺激物質を適宜の濃度で含有するものであり、細胞刺激物質としては、細胞反応検査における目的など種々の要因に基づいて適宜選択されるものであるが、例えば細胞の活性状態または生活状態に作用を与えるもの、細胞の増殖、分化状態を誘導するものなどの、その接触の有無によって生化学的に細胞を刺激する物質であり、例えば種々の栄養素、細胞増殖因子、細胞成長因子、ホルモン物質、医薬、毒性物質、酵素などを挙げることができる。

細胞刺激物質の具体例として、栄養素としては、例えば種々のアミノ酸、ビタミンなどの無機系または有機系栄養素を挙げることができ、細胞増殖因子または細胞成長因子としては、例えば肝細胞増殖因子(HGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、神経細胞成長因子(NGF)、コロニー形成刺激因子(CSF)、内皮細胞増殖因子(ECGF)、細胞分裂増殖因子(CDF)、軟骨由来細胞増殖因子(CDGF)、マクロファージ由来増殖因子(MDGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、トランスフォーミング・グロウス・ファクター(Transforming Growth Factors:TGF)、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン10、トランスフェリン

、ソマトメジンAなどを挙げることができ、ホルモン物質としては、例えばインスリン、エリスロポエチン、コルチコイド、デキサメザゾン、コルチコステロン、グルカゴン、テストステロン、ニコチニアミド、卵胞刺激ホルモン、成長ホルモン、副甲状腺ホルモンなどを挙げることができ、血清としては、牛胎児血清、馬胎児血清、羊血清、ウサギ血清、ヒト血清などを挙げることができる。

また、医薬としては、例えば抗ガン剤、抗エイズ剤などの新規医療薬を挙げることができ、また、その他、ガラクトース、RGDSペプチドなどの受容体結合因子などを挙げができる。

細胞反応検査に供される細胞の種類は、特に限定されるものではないが、その具体例としては、肝実質細胞、線維芽細胞、星型細胞などの肝臓に由来する細胞種、PP細胞、 $\delta$ 細胞、 $\beta$ 細胞（インシュリン分泌細胞）、 $\alpha$ 細胞（グルカゴン分泌細胞）などの胰臓に由来する細胞種、神経幹細胞、内皮細胞、線維芽細胞、骨細胞などを挙げができる。このような細胞としては、例えば動物の臓器または器官に由来するものを好ましく用いることができる。

而して、細胞反応を行うに際して、微小空間部に対して供給される試験液の量としては、含有される細胞刺激物質の種類、細胞刺激物質の含有濃度、液体培地の供給量、目的とする検査の種類などに応じて設定される。

以上において、用いられる液体培地の種類、試験液に含有されるべき細胞刺激物質の種類および濃度、および細胞反応検査に供される細胞の種類に係る組み合わせは特に制限されるものではなく、実行される細胞反応検査の目的に応じて適宜選択することが可能であって、例えば用いられる細胞の種類に応じて細胞刺激物質の種類および濃度を選択することも、また、用いられる細胞刺激物質の種類および濃度に応じて細胞の種類を選択することも可能である。これにより、例えば特定の細胞における特定の細胞刺激物質を含有する試験液に対する耐性、または特定の細胞刺激物質を含有する試験液による作用力の評価などを行うことが可能である。

以上のように、本発明の細胞反応検査用装置によれば、上記の構成を有する液体プロセッサーデバイスを用いることにより、目的とする細胞反応のタイプに応

じて、種々の細胞反応検査方法を容易に実行することが可能である。

すなわち、液体プロセッサーデバイスにおいて、バルブの開閉状態が制御されることにより、目的とされる細胞反応に適した液体流通経路が設定されたマイクロリアクターとしての液体プロセッサーが形成され、この液体プロセッサーが細胞反応検査用装置として利用されることにより、大きな自由度をもって反応条件を設定することが可能であり、結局、当該目的とする細胞反応および細胞反応検査を容易にかつ確実に実行することができる。

本発明の細胞反応検査方法によれば、上記のような細胞反応検査用装置を用いることにより、継続的な液体培地の供給により、好ましい態様で生活状態が維持された細胞に対して、細胞刺激物質を含有する種々の試験液を選定された適宜の態様で供給する細胞反応を容易に実行することができるため、種々の条件を大きな自由度をもって設定した状態で細胞反応検査を実行することができ、結局、特定の細胞または、特定の試験液についての評価を容易に、かつ、確実に行うことができる。

すなわち、従来培養が困難であった臓器などの、例えば肝細胞などの実質細胞の培養、維持が可能となる至的条件を明らかにすることができ、この至的条件において、種々の医薬候補物質のスクリーニングや、種々新規な化合物の毒性試験を好適に、しかも、試験液の添加に使用した流路をバルブの開閉状態を切り替えて変更することにより容易に実行することができる。

また、細胞反応検査用装置はマイクロリアクターとして構成されることにより、細胞反応検査をきわめて小さなスケールで実行することができるため、短い時間で当該細胞反応を実行することができ、従って、細胞反応検査に係る結果を高い効率をもって得ることができる。

#### <複数反応の同時進行例（1）>

この例は、同一種の細胞が複数の微小空間部に位置され、その各々に対して、互いに種類が異なる試験液が供給されて、細胞反応検査が実行される例である。

図6は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの他の具体例を示す説明図である。

すなわち、デバイス10は、その微小空間部X2およびX3のそれぞれに同一種の細胞が位置された上で適宜の態様により当該細胞のコンディショニングが行われた後、バルブの開閉状態が制御されることにより、図6に示すように、バルブH1a、H2bおよびV2Bが閉止状態とされると共に、これら以外のバルブは開放された状態とされた液体プロセッサーとされる。

この液体プロセッサーにおいては、開口V1iから流路部分V1A、微小空間部X1および流路部分H1bを介して微小空間部X2に連通する第1の液体培地供給経路と、この第1の液体培地供給経路から微小空間部X1において分岐して流路部分V1Bを介して微小空間部X3に連通する第2の液体培地供給経路と、開口V2iから流路部分V2Aを介して微小空間部X2に連通する第1の試験液供給経路と、開口H2iから流路部分H2aを介して微小空間部X3に連通する第2の試験液供給経路と、微小空間部X2から流路部分H1c介して開口H1oに連通する第1の液体排出路と、微小空間部X3から流路部分V1C介して開口V1oに連通する第2の液体排出路とが形成され、その他の各流路部分H1a、H2b、H2c、V2BおよびV2Cにおいて液体の流通が禁止された状態が実現されている。

この液体プロセッサーにおいて、液体培地が開口V1iから流入されて微小空間部X2およびX3に供給されると共に、第1の試験液が開口V2iから流入されて微小空間部X2に供給され、また、第1の試験液と含有される細胞刺激物質が異なる第2の試験液が開口H2iから流入されて微小空間部X3に供給され、微小空間部X2およびX3のそれぞれからの液体が第1または第2の液体排出路を介して外部へ排出されることにより、細胞反応検査が実行される。

ここで、第1の試験液および第2の試験液は、同一の細胞刺激物質を異なる濃度で含有するものであってもよい。

細胞が位置される微小空間部としては、その各々が隣接せず、相互が少なくとも同一の空の微小空間部を介して連通する複数個所を選択することが好ましく、これにより、当該細胞が位置される微小空間部に連通する、独立した液体流通経路を大きな自由度をもって形成することが可能である。

以上の細胞反応検査方法によれば、同一の細胞反応検査用装置においてバルブの開閉状態を制御することにより形成された複数の液体流通経路により、細胞反応サイトである複数の微小空間部の各々に対して、共通の供給源から液体培地が供給されて、および、各々独立した試験液供給経路を介して異なる試験液が供給される複数の細胞反応を同時に、かつ、容易に実行することができるため、同一種の細胞における異なる試験液に対する反応結果を検出する細胞反応検査を、それぞれの細胞について、種々の目的に応じて大きな自由度をもって設定された反応条件において同時に並行して実行することができ、結局、種々の試験液および細胞についての評価を高い効率をもって行うことができる。

また、細胞反応検査用装置はマイクロリアクターとして構成されることにより、細胞反応検査をきわめて小さなスケールで実行することができるため、短い時間で当該細胞反応を実行することができ、従って、細胞反応検査に係る結果を高い効率をもって得ることができる。

#### <複数反応の同時進行例（2）>

この例は、異種の細胞が複数の微小空間部に位置され、その各々に対して特定の試験液が供給されて、細胞反応検査が実行される例である。

図7は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの他の具体例を示す説明図である。

すなわち、デバイス10は、その微小空間部X2およびX3のそれぞれに異種の細胞が位置された上で適宜の態様により当該細胞のコンディショニングが行われた後、バルブの開閉状態が制御されることにより、図7に示すように、バルブH1a、H2a、V2AおよびV2Cが閉止状態とされると共に、これら以外のバルブは開放された状態とされた液体プロセッサーとされる。

この液体プロセッサーにおいては、開口V1iから流路部分V1A、微小空間部X1および流路部分H1bを介して微小空間部X2に連通する第1の液体培地供給経路と、この第1の液体培地供給経路から微小空間部X1において分岐して流路部分V1Bを介して微小空間部X3に連通する第2の液体培地供給経路と、開口H2iから流路部分H2c、微小空間部X4およびV2Bを介して微小空間

部X 2に連通する第1の試験液供給経路と、この第1の試験液供給経路から微小空間部X 4において分岐して流路部分H 2 bを介して微小空間部X 3に連通する第2の試験液供給経路と、微小空間部X 2から流路部分H 1 cを介して開口H 1 oに連通する第1の液体排出路と、微小空間部X 3から流路部分V 1 Cを介して開口V 1 oに連通する第2の液体排出路とが形成され、その他の各流路部分H 1 a、H 2 a、V 2 AおよびV 2 Cにおいて液体の流通が禁止された状態が実現されている。

この液体プロセッサーにおいて、液体培地が開口V 1 iから流入されて微小空間部X 2およびX 3に供給されると共に、試験液が開口H 2 iから流入されて微小空間部X 2およびX 3のそれぞれに供給され、微小空間部X 2またはX 3からの液体が、第1または第2の液体排出路を介して外部へ排出されることにより細胞反応検査が実行される。

以上の細胞反応検査方法によれば、同一の細胞反応検査用装置においてバルブの開閉状態を制御することにより形成された複数の液体流通経路により、複数の微小空間部の各々に対して、共通の供給源から液体培地が供給されて、また、共通の供給源から試験液が供給される複数の細胞反応を同時に、かつ、容易に実行することができるため、異種の細胞における特定の試験液に対する反応結果を検出する場合においても、それぞれの細胞について、種々の目的に応じて大きな自由度をもって反応条件が設定された複数の細胞反応検査を、同時に並行して実行することができ、結局、当該特定の試験液、または異種の細胞についての評価を高い効率をもって、かつ、容易に行うことができる。

また、細胞反応検査用装置はマイクロリアクターとして構成されることにより、細胞反応検査をきわめて小さなスケールで実行することができるため、短い時間で当該細胞反応を実行することができ、従って、細胞反応検査に係る結果を高い効率をもって得ることができる。

#### <逐次反応例（単一細胞）>

この例は、選択された微小空間部に位置された細胞に対して、第1の試験液が供給され、その後、当該第1の試験液の供給が停止されると共に、当該第1の試

験液の供給経路と異なる供給経路により第2の試験液が供給されて、細胞反応検査が実行される例である。

図8は、本発明の細胞反応検査方法における液体プロセッサーの他の具体例を示す説明図、図9は、図8に示す液体プロセッサーにおいてバルブの開閉状態が制御されて切り換えられた具体例を示す説明図である。

すなわち、デバイス10は、その微小空間部X2に細胞が位置された上で適宜の態様により当該細胞のコンディショニングが行われた後、バルブの開閉状態が制御されることにより、図8に示すように、バルブH1b、H2c、V1B、V1CおよびV2Cが閉止状態とされると共に、これら以外のバルブは開放状態とされた第1の液体プロセッサーとされる。

この第1の液体プロセッサーにおいては、開口H2iから流路部分H2a、微小空間部X3、流路部分H2b、微小空間部X4および流路部分V2Bを介して微小空間部X2に連通する液体培地供給経路と、開口V2iから流路部分V2Aを介して微小空間部X2に連通する第1の試験液供給経路と、微小空間部X2から流路部分H1c介して開口H1oに連通する液体排出路とが形成され、他の各流路部分H1a、H1b、H2c、V1A、V1B、V1CおよびV2Cにおいて液体の流通が禁止された状態が実現されている。

この状態において、液体培地が開口H2iから流入されて微小空間部X2に供給されると共に、第1の試験液が開口V2iから流入されて微小空間部X2に供給され、微小空間部X2からの液体が液体排出路を介して外部へ排出することにより第1の試験処理が実行される。

そして、この第1の試験処理が終了した後、バルブの開閉状態が制御されて切り換えられることにより、図9に示すように、バルブH1a、H2c、V1B、V1C、V2AおよびV2Cが閉止状態とされると共に、これら以外のバルブは開放状態とされた第2の液体プロセッサーとされる。

この第2の液体プロセッサーにおいては、前記液体培地供給経路と、開口V1iから流路部分V1A、微小空間部X1および流路部分H1bを介して微小空間部X2に連通する第2の試験液供給経路と、前記液体排出路とが形成され、その

他の各流路部分H 1 a、H 2 c、V 1 B、V 1 C、V 2 AおよびV 2 Cにおいて液体の流通が禁止された状態が実現されている。

そして、この第2の液体プロセッサーにおいて、液体培地が開口H 2 iから流入されて微小空間部X 2に供給され、第2の試験液が開口V 1 iから流入されて微小空間部X 2に供給され、微小空間部X 2からの液体が液体排出路を介して外部へ排出されることにより第2の試験処理が実行され、これにより、細胞反応検査が実行される。

ここで、第1および第2の試験液は、相互に異なる試験液であって、例えば異なる種類の細胞刺激物質を含有するもの、または、同一の細胞刺激物質を異なる濃度で含有するものとされればよい。

以上の細胞反応検査方法によれば、同一の細胞反応検査用装置においてバルブの開閉状態を制御することにより形成された適宜の液体流通経路により、単数の細胞に対して異なる試験液が逐次的に供給される細胞反応を容易に実行することができるため、細胞における異なる試験液に対する逐次的な反応結果を検出する場合においても、当該細胞について、大きな自由度をもって、種々の目的に応じた反応条件が設定された異なる試験液に係る複数の試験処理を伴う細胞反応検査を連続的に実行することができ、結局、当該異なる試験液、または細胞についての評価を高い効率をもって、かつ、容易に、行うことができる。

また、細胞反応検査用装置はマイクロリアクターとして構成されることにより、細胞反応検査をきわめて小さなスケールで実行することができるため、短い時間で当該細胞反応を実行することができ、従って、細胞反応検査に係る結果を高い効率をもって得ることができる。

#### <逐次反応例（複数細胞）>

この例は、細胞が複数の微小空間部に位置され、第1の細胞における細胞反応によって産出された細胞反応結果物が第2の細胞に供給されて、細胞反応検査が実行される例である。

図10は、このような細胞反応検査方法における液体プロセッサーの具体例を示す説明図である。

この例において、デバイス10は、その微小空間部X2およびX3のそれぞれに異種、または同一種の細胞が位置された上で適宜の態様により当該細胞のコンディショニングが行われた後、バルブの開閉状態が制御されることにより、図10に示すように、バルブH1a、H2c、V1C、V2AおよびV2Cが閉止状態とされると共に、これら以外のバルブは開放された状態とされた液体プロセッサーとされる。

この液体プロセッサーにおいては、開口V1iから流路部分V1A、微小空間部X1および流路部分H1bを介して微小空間部X2に連通する第1の液体培地供給経路と、この第1の液体培地供給経路から微小空間部X1において分岐して流路部分V1Bを介して微小空間部X3に連通する第2の液体培地供給経路と、開口H2iから流路部分H2aを介して微小空間部X3に連通する第1の試験液供給経路と、この微小空間部X3から流路部分H2b、微小空間部X4および流路部分V2Bを介して微小空間部X2に連通する第2の試験液供給経路と、微小空間部X2から流路部分H1cを介して開口H1oに連通する液体排出路とが形成され、その他の各流路部分H1a、H2c、V1C、V2AおよびV2Cにおいて液体の流通が禁止された状態が実現されている。

この液体プロセッサーにおいて、液体培地が開口V1iから流入されて微小空間部X2およびX3に供給されると共に、試験液が開口H2iから流入されて微小空間部X3に供給され、この微小空間部X3からの第1の細胞による細胞反応結果物、例えばサイトカイン、アルブミン、グルカゴン、インシュリンなどを含有する液が第2の細胞が位置された微小空間部X2に供給され、微小空間部X2からの液体が、液体排出路を介して外部へ排出されることにより細胞反応検査が実行される。

以上の細胞反応検査方法によれば、同一の細胞反応検査用装置においてバルブの開閉状態を制御することにより形成された複数の液体流通経路により、複数の微小空間部の各々に対して、共通の供給源から液体培地が供給されて、また、試験液が供給される第1の細胞が位置された1つの微小空間部からの液体が、他の微小空間部に供給される複数の細胞を用いた逐次的な細胞反応を容易に実行する

ことができるため、複数の異種の細胞間における相互の生化学的関連性を検出する場合においても、それぞれの細胞について、種々の目的に応じて大きな自由度をもって反応条件が設定された細胞反応検査を実行することができ、結局、例えば試験液、または複数の細胞の各々またはそれらの相互関係についてなどの種々の評価を、高い効率をもって、かつ、容易に行うことができる。

また、細胞反応検査用装置はマイクロリアクターとして構成されることにより、細胞反応検査をきわめて小さなスケールで実行することができるため、短い時間で当該細胞反応を実行することができ、従って、細胞反応検査に係る結果を高い効率をもって得ることができる。

以上に説明した細胞反応検査方法を行うために利用される細胞反応検査用装置の構成としては、上記の態様に限定されるものではなく、種々の変更を加えることが可能である。

例えば、複数の液体プロセッサーを組合せた液体プロセッサー複合体により細胞反応検査用装置を構成することができ、この場合には、当該液体プロセッサー複合体は、複数の液体プロセッサーを同一平面に沿って並設することにより、あるいは互いに積重して配設することにより、構成することができる。

液体プロセッサー用デバイスを構成する基材に、横方向微小流路および縦方向微小流路が形成される場合において、それらの数は2であることは必須ではなく、3またはそれ以上であってもよく、また、横方向微小流路の数と、縦方向微小流路の数とが同一であることも必須ではない。更に、横方向微小流路と縦方向微小流路との交差角度が90度であることも必須ではなく、鋭角または鈍角で微小空間部に連通するものであってもよい。

ここで、複数の試験液、または液体培地を予め混合する必要がある場合には、細胞が位置された特定の微小空間部に至るそれぞれの流通経路において、少なくとの同一の流路部分または細胞が位置されていない微小空間部を共有すればよく、例えば共通流路部分を長く設定することにより長い混合時間を得ることができる。

液体プロセッサー用デバイスは、可磁性化膜が基材の裏面の全体に設けられた

構成とすることができる、このような構成によれば、バルブにおける開閉状態の制御を確実に行うことができる。

また、バルブとしては、作動状態において、または非作動状態において、上記の微小流路における液体の流通を阻止する機能を有するものであればよく、その具体的な構成が限定されるものではなく、例えば、電荷を有するバルブボールと、これを電場の作用によって移動させるバルブ制御機構により構成されるものを利用することもできる。

本発明の細胞反応検査用装置の実際の使用においては、目的とする反応が高い効率で生起されるべき条件の設定を達成するために必要な措置を講ずることができる。例えば、液体流通経路を構成する流路部分のうちの特定のものに加熱手段、その他の補助手段を設けることができる。

### 発明の効果

本発明の細胞反応検査用装置によれば、液体プロセッサー用デバイスにおいて、微小流路網を構成する微小流路に係るバルブにおける開閉状態を選択的に制御することにより、実行すべき細胞反応検査の種類に応じて必要とされる、細胞反応サイトに対する液体流通経路を大きな自由度で設定することができる。従って、当該細胞反応検査における反応条件の設定を大きな自由度をもって行うことが可能であり、結局、目的とする細胞反応および細胞反応検査を容易にかつ確実に実行することができる。

本発明の細胞反応検査方法によれば、上述の細胞反応検査用装置を用いることにより、選択された微小空間部に位置された生きた細胞に対して、大きな自由度をもって反応条件を設定することができるため、当該細胞に対する所期の反応を種々の異なる条件で容易に行うことができると共に、当該反応による結果を高い効率で検出することができる。従って、複数の細胞に対して、同一の条件下において、種々の細胞刺激物質を供給することによる細胞反応検査を行うことが可能である。

また、細胞反応をきわめて小さいスケールで行うことが可能であるため、当該

細胞反応の結果を短時間で得ることができる。

## 請　求　の　範　囲

## 〔1〕板状の基材と、

この基材に形成された、第1の方向に伸びる複数の第1の微小流路および前記第1の方向と異なる第2の方向に伸びる複数の第2の微小流路と、

第1の微小流路と第2の微小流路との交差部に形成された微小空間部と、

微小空間部に連通する微小流路に設けられた、当該微小流路を開閉するバルブと、

当該バルブの各々をその閉止状態と開放状態との間で制御するバルブ制御機構とを備えてなる液体プロセッサー用デバイスよりなり、

生きている細胞が位置された選択された微小空間部に連通する微小流路の1つを介して当該細胞の生存に必要な液体培地が供給されると共に、当該微小空間部に連通する他の微小流路を介して細胞刺激物質を含有する試験液が供給され、当該試験液によって生ずる当該細胞における反応を検査する細胞反応検査に用いられることを特徴とする細胞反応検査用装置。

## 〔2〕板状の基材と、

この基材に形成された、第1の方向に伸びる複数の第1の微小流路および前記第1の方向と交差する第2の方向に伸びる複数の第2の微小流路と、

第1の微小流路と第2の微小流路との交差部に形成された微小空間部と、

微小空間部に連通する微小流路に設けられた、当該微小流路を開閉するバルブと、

当該バルブの各々をその閉止状態と開放状態との間で制御するバルブ制御機構とを備えてなる液体プロセッサー用デバイスを用い、

細胞が位置された選択された微小空間部に、当該微小空間部に連通する微小流路の1つを介して当該細胞の生存に必要な液体培地を供給されると共に、当該微小空間部に連通する他の微小流路を介して細胞刺激物質を含有する試験液を供給し、これによって生ずる当該細胞における反応を検査することを特徴とする細胞反応検査方法。

[3] 複数の微小空間部に同一種の細胞が位置され、当該複数の微小空間部に、細胞刺激物質を含有する異なる試験液が供給されることを特徴とする請求項2に記載の細胞反応検査方法。

[4] 複数の微小空間部に異種の細胞が位置され、当該複数の微小空間部に、細胞刺激物質を含有する同一の試験液が供給されることを特徴とする請求項2に記載の細胞反応検査方法。

[5] 板状の基材と、

この基材に形成された、第1の方向に伸びる複数の第1の微小流路および前記第1の方向と交差する第2の方向に伸びる複数の第2の微小流路と、

第1の微小流路と第2の微小流路との交差部に形成された微小空間部と、

微小空間部に連通する微小流路に設けられた、当該微小流路を開閉するバルブと、

当該バルブの各々をその閉止状態と開放状態との間で制御するバルブ制御機構とを備えてなる液体プロセッサー用デバイスを用い、

細胞が位置された選択された微小空間部に、当該微小空間部に連通する微小流路の1つを通して当該細胞の生存に必要な液体培地を供給すると共に、当該微小空間部に連通する微小流路の他の1つを通して細胞刺激物質を含有する第1の試験液を供給する第1の試験処理と、

この第1の試験処理の後、当該微小空間部に連通する微小流路のバルブの開閉状態を切り換えることにより、第1の試験液の供給を停止すると共に、当該第1の試験液の供給経路と異なる供給経路により、細胞刺激物質を含有する、第1の試験液とは異なる第2の試験液を供給する第2の試験処理と

が行われ、これによって生ずる当該細胞における反応を検査することを特徴とする細胞反応検査方法。

[6] 第1の試験液および第2の試験液は、互いに種類または濃度が異なる細胞刺激物質を含有してなるものであることを特徴とする請求項5に記載の細胞反応検査方法。

[7] 微小空間部に位置される細胞が動物の臓器または器官に由来する細胞であ

り、第1の試験液および第2の試験液に含有される細胞刺激物質が、細胞成長因子、細胞増殖因子、ホルモン、栄養素および血清から選ばれたものであることを特徴とする請求項5または請求項6に記載の細胞反応検査方法。

[8] 細胞における反応の検査が、当該細胞によって產生される產生物質の検出であることを特徴とする請求項2～請求項7のいずれかに記載の細胞反応検査方法。

[9] 板状の基材と、

この基材に形成された、第1の方向に伸びる複数の第1の微小流路および前記第1の方向と交差する第2の方向に伸びる複数の第2の微小流路と、

第1の微小流路と第2の微小流路との交差部に形成された微小空間部と、

微小空間部に連通する微小流路に設けられた、当該微小流路を開閉するバルブと、

当該バルブの各々をその閉止状態と開放状態との間で制御するバルブ制御機構とを備えてなる液体プロセッサー用デバイスを用い、

各々細胞が位置された選択された複数の微小空間部に、当該複数の微小空間部の各々に連通する微小流路の1つを介して細胞の生存に必要な液体培地を供給すると共に、当該複数の微小空間部の各々に連通する微小流路の他の1つを介して細胞刺激物質を含有する試験液を供給する細胞反応検査において、

第1の細胞による細胞反応結果物が第2の細胞に供給されることを特徴とする細胞反応検査方法。

図 1

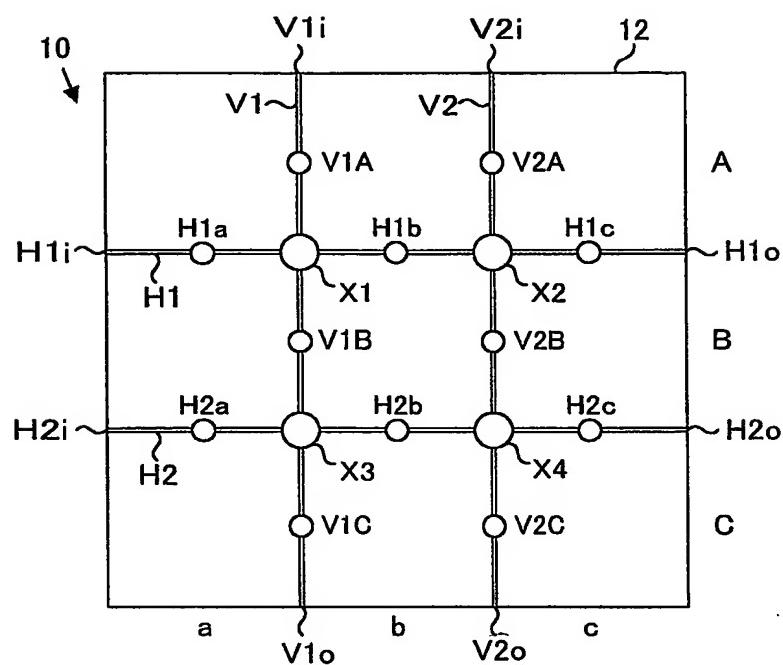
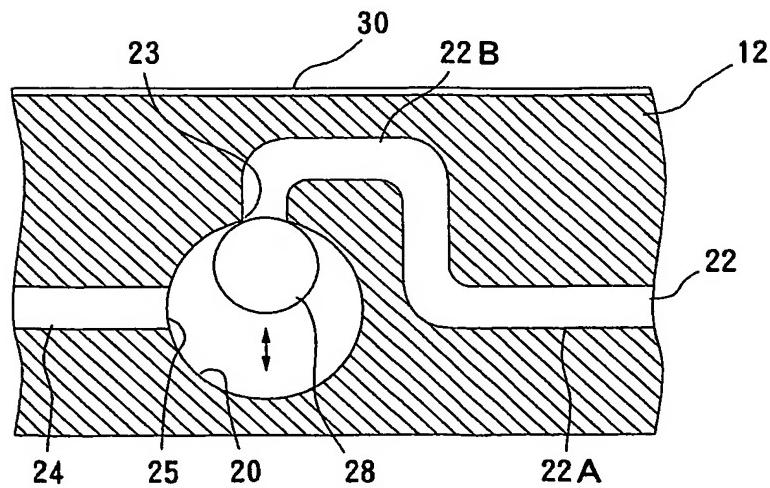


図 2



2 / 8  
図 3

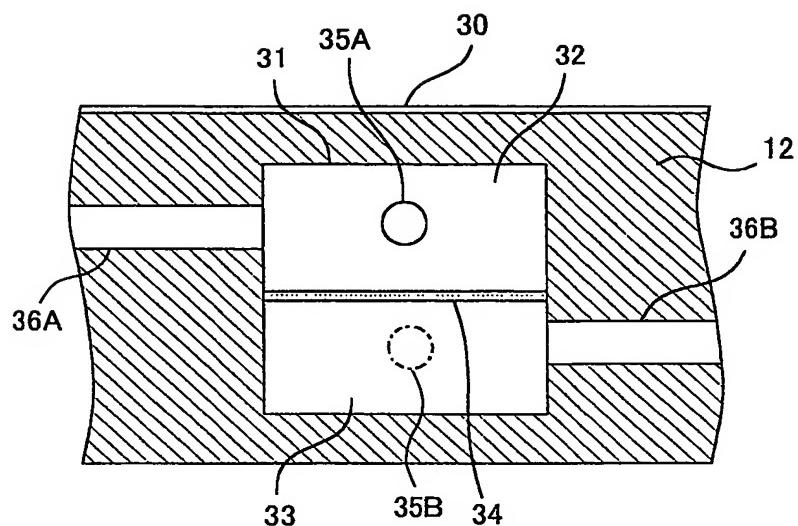
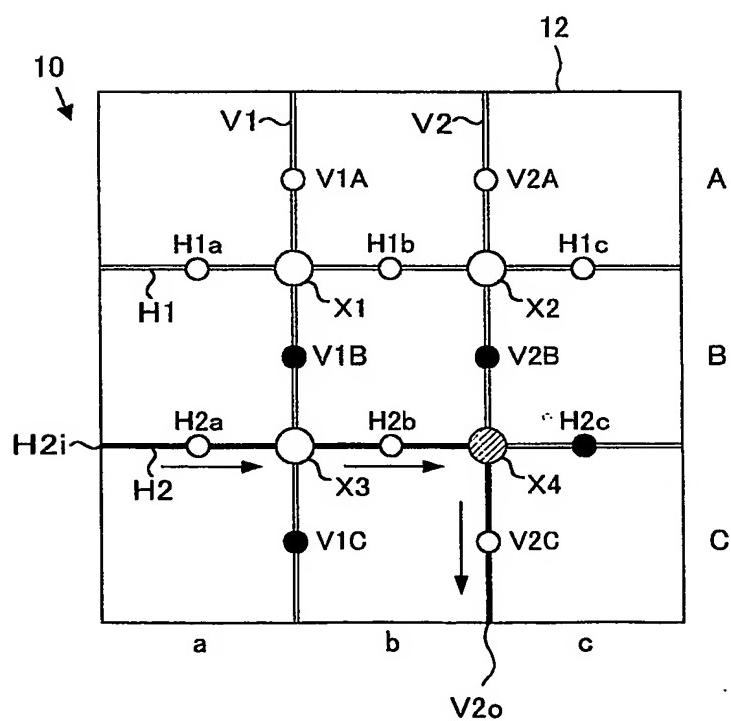
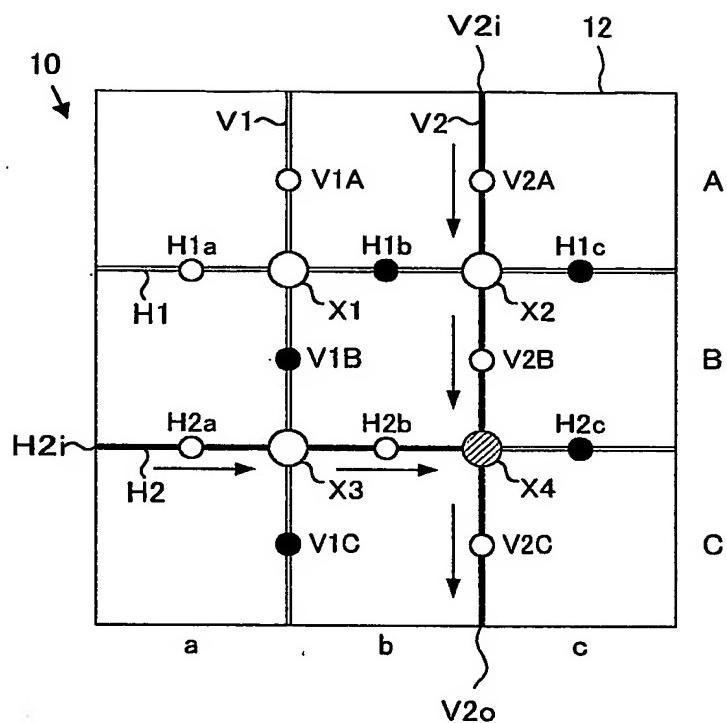
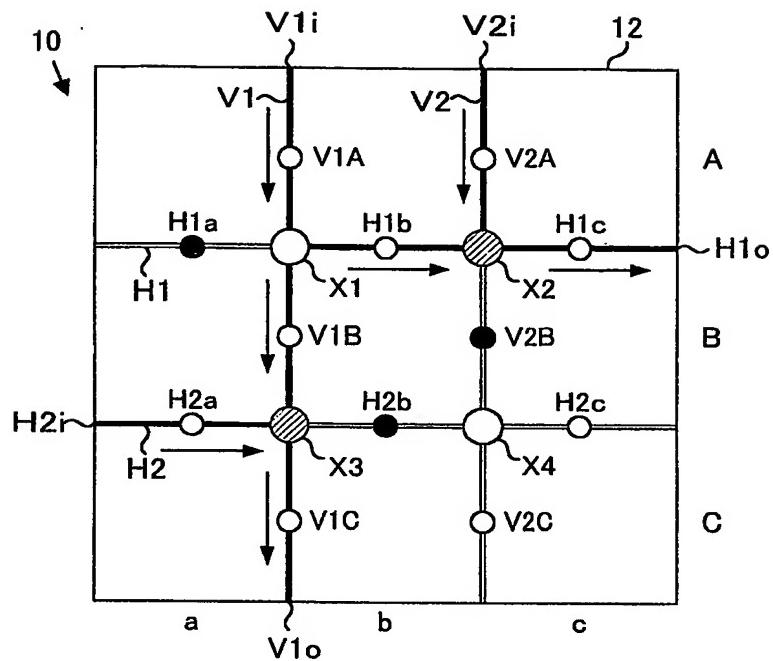


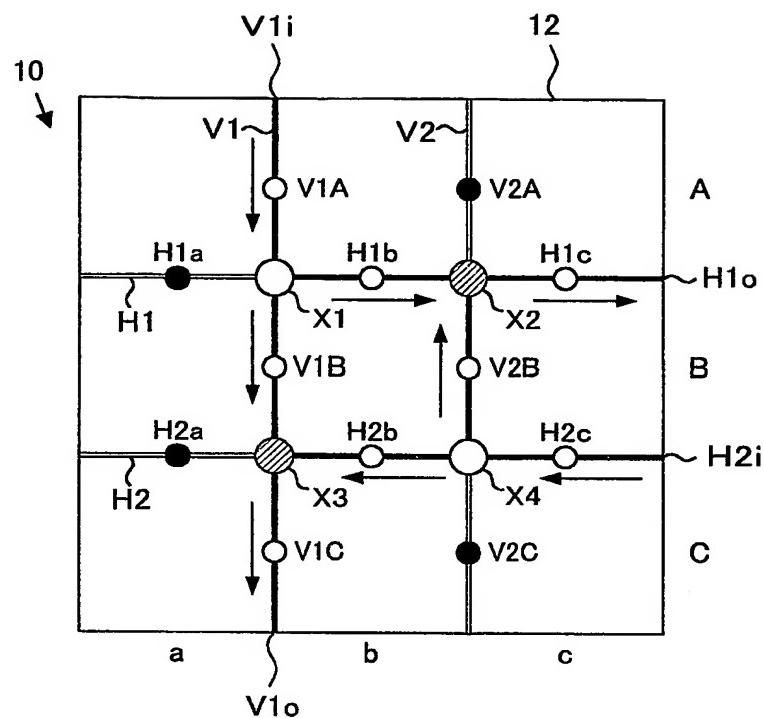
図 4

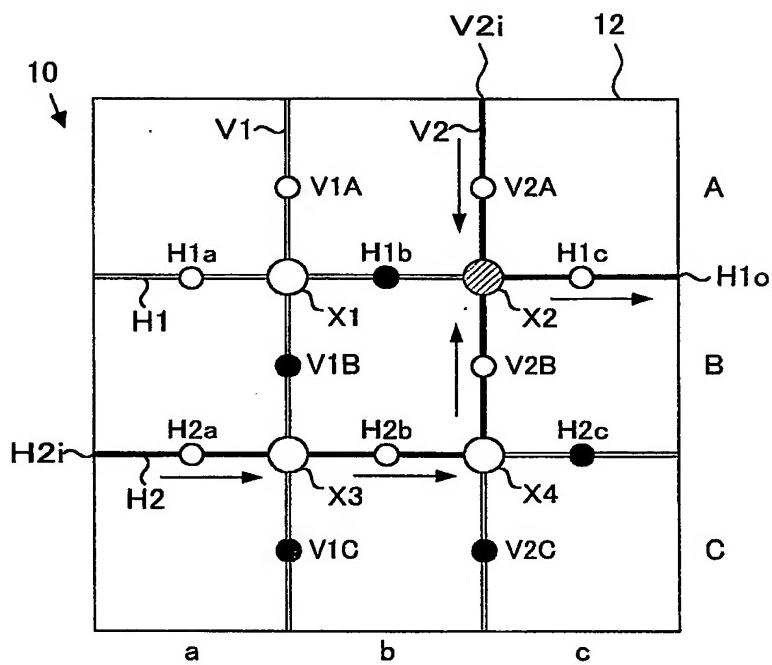


3 / 8  
☒ 5

4 / 8  
図 6

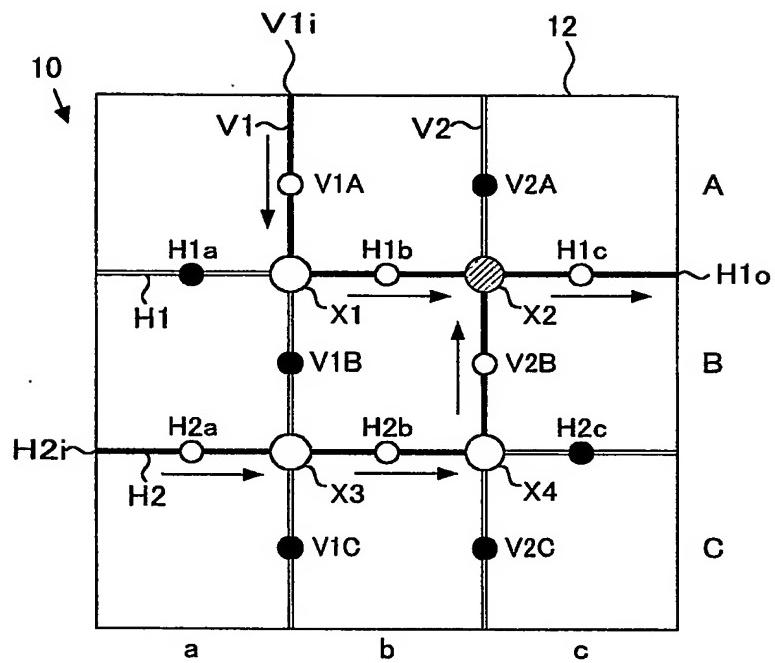


5 / 8  
☒ 7

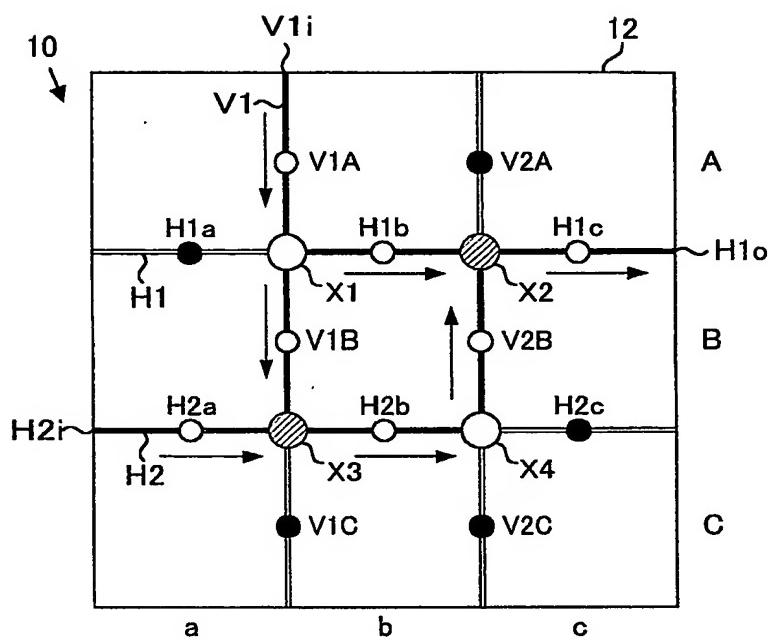
6 / 8  
図 8

7 / 8

図 9



8 / 8  
図 10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10574

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/34, C12Q1/04, G01N35/08, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/00-C12M3/10, C12Q1/00-C12Q3/00, G01N35/00-G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus (JOIS), CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/33559 A1 (Cepheid), 08 July, 1999 (08.07.99), & JP 2001-527220 A & EP 1179585 A2 & US 6368871 B1	1-9
A	WO 99/47922 A2 (Massachusetts Institute of Technology), 23 September, 1999 (23.09.99), & EP 1064353 A1 & US 6197575 B1	1-9
A	JP 2002-136287 A (Takashi KORENAGA), 14 May, 2002 (14.05.02), (Family: none)	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
03 October, 2003 (03.10.03)

Date of mailing of the international search report  
14 October, 2003 (14.10.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int C1' C12M1/34, C12Q1/04, G01N35/08, G01N37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int C1' C12M1/00-C12M3/10, C12Q1/00-C12Q3/00, G01N35/00-G01N37/00

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JST Plus (JOIS)

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPI(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/33559 A1 (Cepheid), 1999. 07. 08, &JP 2001-527220 A &EP 1179585 A2 &US 6368871 B1	1-9
A	WO 99/47922 A2 (Massachusetts Institute of Technology), 1999. 09. 23, &EP 1064353 A1 &US 6197575 B1	1-9
A	JP 2002-136287 A (伊永 隆史), 2002. 05. 14, (ファミリーなし)	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

03. 10. 03

## 国際調査報告の発送日

14.10.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

田中 春一郎

4B 9636



電話番号 03-3581-1101 内線 3446